

## 8.1 生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究

研究予算：運営費交付金(一般勘定)

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：水環境研究グループ(水質)

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、北村友一、村山康樹

### 【要旨】

医薬品等の生理活性物質は、環境ホルモン同様、低濃度での水生生物への影響が懸念されており、新たな環境汚染問題となっている。このため、生理活性物質が水環境に与える影響を評価し、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じることが求められている。本研究は、医薬品等の生理活性物質の分析法開発、水環境中での実態把握と挙動解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に対して与える影響の評価手法を提案することを目的としている。平成 21 年度は、抗ウイルス剤(タミフル)の分析法開発、水環境中での医薬品の実態把握、バイオアッセイ手法による医薬品類の生態影響評価及び河川水の生態リスク評価を行った。

キーワード：医薬品、一斉分析法、実態把握、バイオアッセイ、生態影響評価

### 1. はじめに

医薬品等の生理活性物質は、使用の後に水環境中に排出される。これらの物質は環境ホルモン同様、低濃度での水生生物への影響が懸念されており、新たな環境汚染問題となっている。このため、生理活性物質が水環境に与える影響を評価し、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じることが求められているが、それには、生理活性物質の水環境での実態を把握するとともに、水環境中での挙動を解明することが必要である。さらに、水生生物への影響を評価するために、生理活性物質の含まれた環境水の生物影響ポテンシャルを評価する手法が求められている。

このため本研究課題では、医薬品等の生理活性物質の分析方法を開発するとともに、水環境中での実態把握と挙動解明、医薬品等の特性に応じたグルーピングと分析方法および挙動予測手法の提案を行うことを目的とする。さらに、水生生態系への影響を評価するため、様々な生物種を用いたバイオアッセイ手法により医薬品等の評価を行うとともに、生理活性物質の含まれた環境水の生物影響ポテンシャルを評価する手法および水質リスク評価法の提案を行うことを目的とする。

平成 21 年度は、抗ウイルス剤(タミフル)分析法開発、水環境中での医薬品等の実態把握、バイオアッセイ手法による医薬品類の生態影響評価及び河川水の生態リスク評価を実施した。

### 2. 抗ウイルス剤(タミフルとその代謝物)の下水試料中の分析

#### 2.1 目的

タミフル(Oseltamivir phosphate: OP、[図-2.1](#))はA型及びB型インフルエンザウイルス感染症に対する抗インフルエンザウイルス剤であり、服用後、肝臓のエステラーゼにより加水分解され、Oseltamivir carboxylate(OC、[図-2.2](#))に代謝される<sup>1)</sup>。また、服用されたOPの約7割は尿から排泄され<sup>1)</sup>、下水等を通じて河川水中へ放出される。一方、昨今の世界的なインフルエンザの大流行により、OP使用量が増加しており、それに伴う水質汚染問題が社会的関心事となっている。しかしながら、下水中のOPやOCを対象とした調査例は極めて少ない<sup>2)</sup>。この理由の一つとして、分析法開発の遅れが指摘される。

このため、本研究では、下水中の OP と OC の LC-MS/MS による高精度分析法の検討を行った。本検討は、(独)土木研究所と(株)島津テクノリサーチの「共同研究」で実施した。

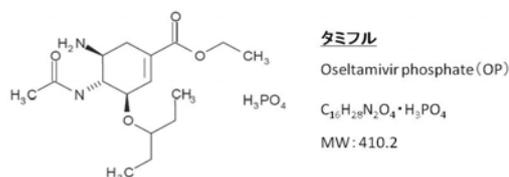


図-2.1 Oseltamivir phosphate(OP)

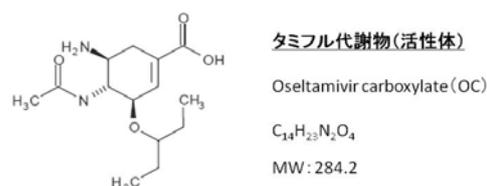


図-2.2 Oseltamivir carboxylate(OC)

## 2.2 方法

OP の標準物質には APAC Pharmaceutical 製の Oseltamivir phosphate を、OC には Sigma-Aldrich 製の Oseltamivir acid hydrate を使用した。

前処理方法は、採水した試料(100 mL)をガラス繊維ろ紙でろ過し、Oasis HLB(Waters)による固相抽出を行った。メタノールで溶出後、5 mL に定容し、2.5 mL を分取して、ENVI-Carb(SUPELCO)による精製後、1mL に定容したものを測定用試料とした。分析フローの抽出操作を図-2.3、精製操作を図-2.4 に示す。



図-2.3 抽出操作

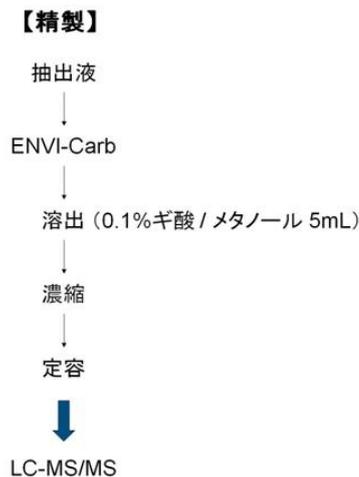


図-2.4 精製操作

抽出・精製液の測定条件は以下のとおりとした。液体クロマトグラフは Prominence(島津製作所)、質量分析計は API 3200(Applied Biosystems)、イオン化法は ESI-Positive を採用し、OP は  $[M-H_3PO_4+H]^+$ 、OC は  $[M+H]^+$  をプリカーサーイオンとして選定し、それぞれ

定量イオンは、OP : 313.2 / 225.0、OC : 285.2 / 138.0 とした。カラムは Synergi 4u MAX-RP(2.0×150 mm、phenomenex)、移動相には 0.1% 硝酸水溶液とメタノールを使用して、グラジエント条件で測定を行った。

実試料を用いた添加回収試験は、標準活性汚泥法で運転している活性汚泥処理実験装置の流入水を 2009 年 7 月に採水したものをを用いた。

## 2.3 結果と考察

検量線は OP、OC ともに  $r^2=0.999$  と良好な直線性が得られた(表-2.1)。装置検出下限値(IDL)については、試料換算値で OP : 0.34ng/L、OC : 0.29ng/L であり、ばらつき(CV)も極めて小さかった(表-2.2)。採水した流入水に、20 ng/L となるように標準物質を添加して行った添加回収試験(n=5)からも、平均回収率 : 80%、CV : 5%以下と良好な結果が得られた(表-2.3)。従って本研究で開発した分析法は、下水中の OP、OC の定量分析に適用可能であることが確認された。また、OP、OC 各標準物質のメタノール溶液のクロマトグラムを図-2.5、図-2.6 に示す。OP、0.1ng/mL、OC、0.05ng/mL の濃度で S/N 比が 5 以上であり、分離が確認されている。

表-2.1 OP と OC の検量線

化合物	検量線範囲 (ng/mL)	$r^2$
タミフル(OP)	0.05-5	0.999
タミフル代謝物(OC)	0.05-5	0.999

表-2.2 OP と OC の装置検出下限値(IDL)

化合物	注入液濃度 (ng/mL)	IDL (ng/mL)	IDL試料換算値 (ng/L)	CV (%)
タミフル(OP)	0.1	0.017	0.34	4.3
タミフル代謝物(OC)	0.05	0.015	0.29	6.6

$$\text{※IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

表-2.3 添加回収試験結果(流入水、n=5)

化合物	試料	添加濃度 (ng/L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
タミフル(OP)	下水 (流入水)	20	16	80	4.1
タミフル代謝物(OC)		20	16	80	2.6

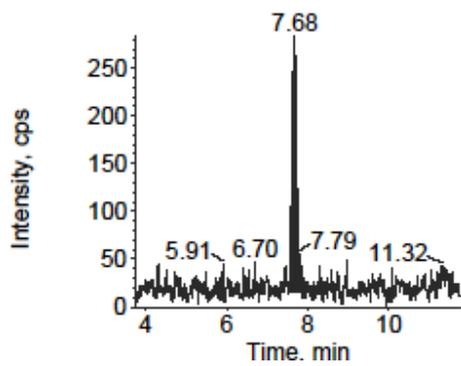


図-2.5 OP 標準液のクロマトグラム

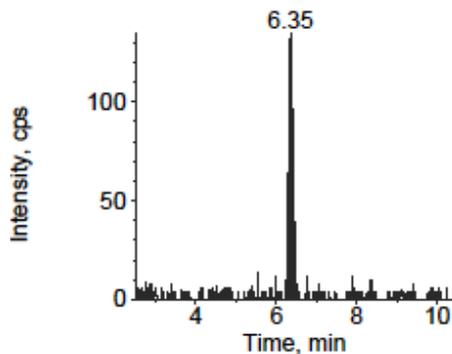


図-2.6 OC 標準液のクロマトグラム

## 2. 4 今後の展開と課題

本研究において抗ウイルス剤の分析法開発を行った。分析装置の検出下限値は試料換算濃度でOPが0.34ng/L、OCが0.29ng/Lであった。また、流入下水を用いた添加回収試験の結果、OP、OCとも80%の回収率が得られ下水試料への適用が可能である。今後は、本分析法を用い水環境中のOP、OCの実態把握を実施していく必要がある。また、他の抗ウイルス剤についても分析法の検討・開発を継続する必要がある。

## 3. 晴天時、雨天時の小河川における医薬品類の存在実態

### 3. 1 目的

新たな微量化学物質汚染として注目されている医薬品類の環境水中の存在実態については多くの調査報告がみられる。しかしながら、晴天時の調査報告がほとんどであり雨天時の流出状況については情報が不足している。本研究では農村地域の小河川において晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出実態の比較を行った。

### 3. 2 対象医薬品及び分析方法

調査対象とした医薬品類は、Acetaminophen、

Amoxicillin、Azithromycin、Caffeine、Chlortetracycline、Clarithromycin、N,N-diethyl-m-toluamide、Oxytetracycline、Sulfamethoxazole、Sulfamonomethoxine、Tetracycline、Theophylline、Trimethoprimの13物質とした。医薬品類の分析方法は、小西ら<sup>3)</sup>の方法を参考に抽出・濃縮等の前処理を行った後、LC/MS/MSを用いて測定し絶対検量線法により定量した。

### 3. 3 調査方法

調査地点は、既に報告<sup>4)</sup>した霞ヶ浦・北浦に流入する銚田川の支川(St.3、St.5)とした。調査地域の土地利用状況は、田、畑、人口林、広葉樹林が90%を占める農村地域であり、各地点の集水面積はそれぞれ5.4km<sup>2</sup>、3.9km<sup>2</sup>である。調査は2008年5月～10月の晴天時に6回、雨天時に4回行った。SS、BOD、COD、DOC、NHRR<sub>4-N</sub>の一般水質分析用試料、医薬品類分析用試料の採取と試料採取時の流量観測を行った。

### 3. 4 調査結果と考察

晴天時試料採取時の流量は、St.3は0.06～0.10m<sup>3</sup>/sec(平均0.08m<sup>3</sup>/sec)、St.5は0.01～0.11m<sup>3</sup>/sec(平均0.07m<sup>3</sup>/sec)であった。また、雨天時試料は降雨(降雨量:17～27mm)の途中で試料採取を行った。試料採取時の流量は、St.3は0.12～0.26m<sup>3</sup>/sec(平均0.16m<sup>3</sup>/sec)、St.5は0.19～0.34m<sup>3</sup>/sec(平均0.25m<sup>3</sup>/sec)であり、晴天時の2倍(St.3)、3.6倍(St.5)であった。

晴天時、雨天時に採取した試料は持ち帰った後、SS、BOD、COD、DOC、NH<sub>4</sub>-Nの5項目について分析を行った。その平均値を図-3.1に示す。多くの測定項目の濃度は晴天時に比べ雨天時に高い値を示した。St.3ではSS(8.5倍)、BOD(5.3倍)、COD(4.5倍)、DOC(1.7倍)、NH<sub>4</sub>-N(5.3倍)であった。また、St.5ではSS(7.9倍)、BOD(1.7倍)、COD(2.0倍)、DOC(0.7倍)、NH<sub>4</sub>-N(1.2倍)であった。これらの結果からSt.3はSt.5に比べ雨天時における有機性汚濁物質の流出が顕著である。集水域に降雨により流出しやすい有機性物質の汚濁源が存在することが示され

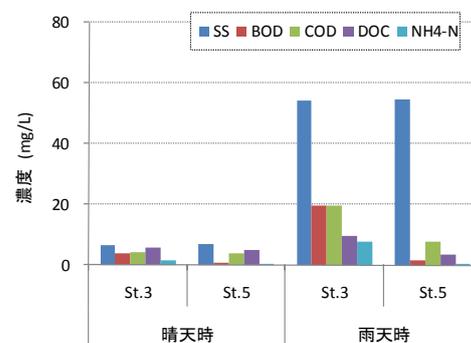


図-3.1 一般水質項目分析結果(平均値)

る。

晴天時、雨天時の医薬品類分析結果(平均値)を表-3.1に示す。平均値の算出にあたり実測値が検出下限値以下のものについては0(ゼロ)とした。また、晴天時と雨天時の医薬品類濃度を比較するため雨天時/晴天時の濃度比を算出し図-3.2に示す。

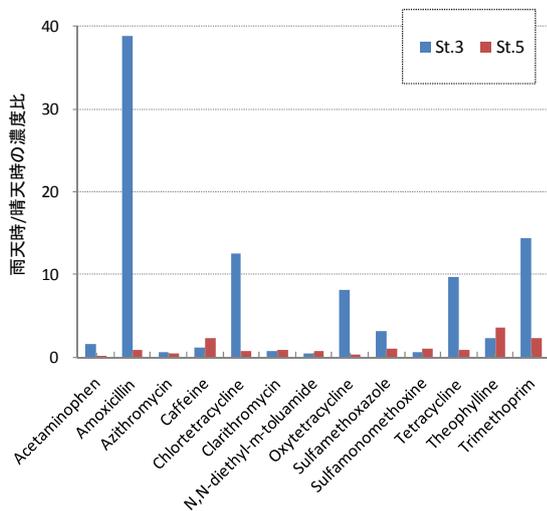


図-3.2 晴天時と雨天時の医薬品類濃度比較

雨天時/晴天時の濃度比は、St.3の日用医薬品6物質(Acetaminophen、Azithromycin、Caffeine、Clarithromycin、N,N-diethyl-m-toluamide、Theophylline)で0.6~2.3を、人・動物両用医薬品6物質(Amoxicillin、Chlortetracycline、Oxytetracycline、Sulfamethoxazole、Tetracycline、Trimethoprim)で3.2~39、動物用医薬品のSulfamonomethoxineで0.6を示した。日用医薬品6物質と動物用医薬品1物質の雨天時/晴天時の濃度比は、ほぼ0.5~2の範囲であり晴天時、雨天時において大きな濃

度変動は見られなかったが、人・動物両用医薬品6物質は3倍以上と雨天時において濃度上昇が著しく、なかでもAmoxicillin、Chlortetracycline、Oxytetracycline、Tetracycline、Trimethoprimの5物質は、約10倍あるいはそれ以上と大きな濃度上昇が見られた。前述した有機性汚濁物質同様、集水域に降雨により流出しやすい医薬品類が存在することが示された。集水域内を現地踏査したところ、いくつか養豚場の存在が確認されたが、これらが負荷源の一つである可能性がある。

St.5では多くの物質において雨天時/晴天時の濃度比は0.4~3.6の範囲であり雨天時における大幅な濃度上昇は見られなかった。逆にAcetaminophenでは晴天時の1/10以下を示したが、雨による希釈が一因と考えられる。

### 3.5 今後の展開と課題

晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出特性を比較した。雨天時において晴天時の10倍あるいはそれ以上の濃度で流出する医薬品類がみられ、水環境中における医薬品類調査における雨天時調査の重要性が明らかになった。今後は、降雨による流出負荷量の把握など、更に詳しい調査を実施する予定である。

## 4. 湖沼流入河川の医薬品負荷量と湖沼内の医薬品濃度の関係

### 4.1 目的

本研究では、平成20年度の報告に続き湖沼とその流入河川における医薬品の存在実態について調査を実施した。

### 4.2 調査方法

#### 4.2.1 試料採取地点

面積36km<sup>2</sup>の湖沼内で3ヶ所とその流入河川11ヶ所、合計14ヶ所で試料を採取した(図-4.1)。2009年3月12日に採取し、アスコルビン酸とNa<sub>2</sub>EDTAを各約1g/L添

表-3.1 晴天時・雨天時の医薬品類分析結果(平均値)

物質名	検出下限値 (ng/L)	St.3		St.5	
		晴天時	雨天時	晴天時	雨天時
Acetaminophen	0.4	2.9	4.6	1.4	0.1
Amoxicillin	0.9	17	650	3.8	3.4
Azithromycin	0.4	1.2	0.7	1.2	0.6
Caffeine	5.7	52	61	13	32
Chlortetracycline	1.9	42	530	6.1	4.7
Clarithromycin	1.7	17	12	15	13
N,N-diethyl-m-toluamide	0.2	3.0	1.3	1.4	1.1
Oxytetracycline	1.3	16	130	7.4	3.0
Sulfamethoxazole	1.5	7.1	23	0.8	0.8
Sulfamonomethoxine	1.8	8.4	5.3	0.9	0.9
Tetracycline	1.4	8.9	86	4.8	4.5
Theophylline	0.5	1.4	3.1	0.2	0.6
Trimethoprim	1.6	0.8	12	0.4	0.8

加後、冷却しながら分析所に持ち帰った。湖沼流入河川水は試料採取時に流量観測を合わせて行った。試料採取時の流量を図4.1の( )内に示した。

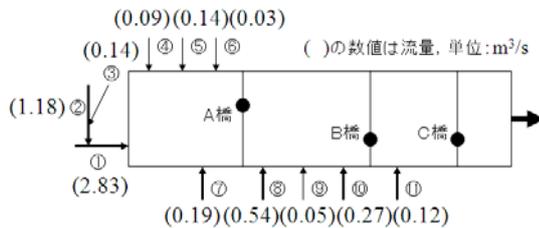


図4.1 試料採取地点と流入河川の流量

#### 4.2.2 調査対象物質および分析方法

調査対象とした医薬品は、解熱鎮痛消炎剤、利尿剤、抗生物質、不整脈用剤、高脂血症用剤等 92 物質とした。これら 92 物質の分析は、小西ら<sup>3)</sup>の方法を参考に抽出・濃縮等の前処理を行った後、LC/MS/MSを用いて測定し絶対検量線法により定量した。

#### 4.3 調査結果と考察

92 物質中 46 物質が 14 ヶ所のいずれかの試料で検出され、その検出濃度は Carbamazepine、Clofibric acid、Naproxen 等の 0.1ng/L から Caffeine の 540ng/L であった。また、14 ヶ所すべての地点から Clarithromycin、Crotamiton、N,N-Diethyl-m-toluamide、Indomethacin、Theophylline、Amoxicillin、Griseofulvin、Caffeine の 8 物質が検出された。

Clarithromycin を例として各流入河川水の濃度と負荷量を図4.2、図4.3 に示した。流入河川水の濃度は、流入河川⑧が最も低く 4.6ng/L で、流入河川③が最も高く 66ng/L であった。また、調査流入河川の負荷量から平均濃度を算出し、湖沼内 3 地点(A 橋、B 橋、C 橋)の濃度とともに図4.4 に示した。負荷量から算出した平均濃度(18ng/L)は、A 橋(13ng/L)、B 橋(10ng/L)、C 橋(9.5ng/L) の濃度とほぼ同じ値を示した。14 ヶ所すべての地点から検出された 8 物質について clarithromycin 同様、負荷量から平均濃度を算出し、湖沼内濃度と併せ、表4.1 に示した。

N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、本調査における晴天時河川流入以外にも負荷が存在する可能性が示された。

#### 4.4 今後の展開と課題

湖沼流入河川の医薬品負荷量から算出した流入河川の平均濃度と湖沼内の医薬品濃度を比較したところ、N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、本調査における晴天時河川流

入以外にも負荷が存在する可能性が示された。今後は、更に詳細な調査、あるいは雨天時においても同様の調査を実施し、全体的な医薬品流出特性の把握を検討する必要がある。

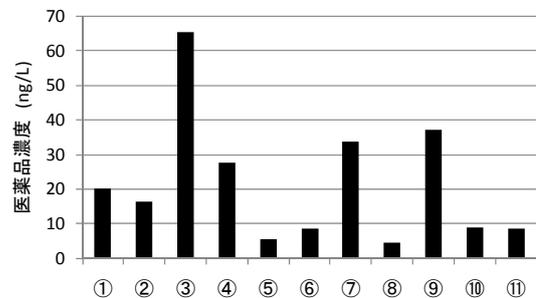


図4.2 各試料の clarithromycin 濃度

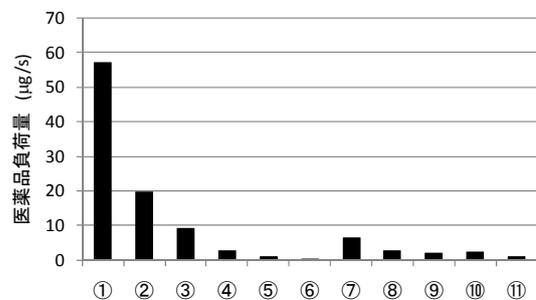


図4.3 各試料の Clarithromycin 負荷量

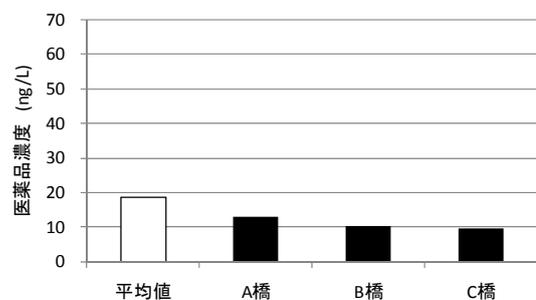


図4.4 Clarithromycin 平均濃度と湖内濃度

表4.1 負荷量から求めた平均濃度と湖沼内濃度(ng/L)

医薬品	平均値	A橋	B橋	C橋
clarithromycin	18	13	10	9.5
crotamiton	13	13	9.1	7.5
N,N-diethyl-m-toluamide	1.2	2.7	3.5	3.8
indomethacin	4.6	0.9	0.6	0.4
theophylline	2.5	6.5	3.5	2.7
amoxicillin	3.5	13	3.4	2.4
griseofulvin	0.6	1.2	0.9	0.8
caffeine	110	110	43	41

## 5. バイオアッセイによる医薬品類の生態影響評価

### 5.1 目的

河川水や下水処理水などの環境水中に存在する生理活性物質は、水生生態系を構成する水生生物の生育・生息に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる

生理活性物質の中で医薬品類は、その使用目的から、生物の生体機能へ影響を及ぼす性質を持ち、また、その作用を生体内で維持できるように化学構造が設計されている。一方で、生理活性物質による影響の種類、大きさは生物種ごとに異なることが予測される。医薬品類では、主な投与対象であるヒトなどへの作用については、開発段階における齧歯類等を用いた動物実験を通じて多くの情報が得られているが、それらが体外へ排出された後の環境中の様々な生物への影響(生態影響)の把握については、我が国の法令では義務付けられておらず、十分明らかにされていない。

そこで本研究では、医薬品類が水生生物に及ぼす影響についての知見を充実させ、生態リスク評価方法の検討に資することを目的とし、昨年度に引き続き、水環境中において存在が確認されてきている様々な医薬品類を対象に、細菌、藻類及び甲殻類の3生物種を用いたバイオアッセイ手法を適用し、生態毒性データの集積を行った。

### 5.2 対象医薬品

評価対象とする医薬品類は、環境中で検出された報告のある物質を中心に選定した。本研究課題では昨年度までに、解熱鎮痛薬、神経系作用薬、循環器薬、消化器薬、抗菌薬など、表-5.1に示す医薬品類44物質について、5生物種に対する生態毒性データを把握してきた。

今年度は、実環境中での検出状況や定量的構造活性相関(QSAR)の予測値を参考に、Bromovalerylurea(ブロモワレリル尿素;催眠・鎮静剤)、Disopyramide(ジソピラミド;循環器官用薬)、Ifenprodil tartrate(酒石酸イフェンプロジル;循環器官用薬)、Indometacin(インドメタシン;解熱鎮痛消炎剤)、Sulfamethoxazole(スルファメトキサゾール;化学療法剤)、Thiamphenicol(チアンフェニコール;合成抗菌剤)、Trimethoprim(トリメトプリム;化学療法剤)の7物質を対象とした。

各医薬品類について、working solution としてDMSOを溶媒に10g/Lの溶液を調製した後、適宜希釈して試験に用いた。各試験においては、曝露溶液中の溶媒(DMSO)濃度が0.1%を超えないように最大曝露濃度を10mg/L程度に設定し、細菌、藻類では公比2(10段階)、甲殻類では公比2(5段階)の希釈系列を作成した。

### 5.3 バイオアッセイ手法の概要

表-5.1 21年度までに評価した医薬品類44物質

循環器官用薬 (9物質)	acetazolamide, atenolol, bezafibrate, caffeine, diltiazem, dipyridamole, furosemide, sotalol, verapamil
解熱鎮痛消炎剤 (8物質)	diclofenac, etheznamide, fenoprofen, flufenamic acid, ibuprofen, ketoprofen, mefenamic acid, naproxen
精神神経用剤 抗てんかん剤 (7物質)	amitriptyline, carbamazepine, chlorpromazine, haloperidol, imipramine, phenytoin, primidone
合成抗菌薬 抗生物質製剤 (5物質)	azithromycin, chloramphenicol, clarithromycin, levofloxacin, nalidixic acid
消化器官用薬 (3物質)	metoclopramide, pirenzepine, sulpiride
その他(12物質)	crotamiton, dexamethasone, dextromethorphan, N,N-diethyl-m-toluamide, diphenidol, novobiocin, promethazine, 2-quinoxaline carboxylic acid, thymol, tolbutamide, tolperisone, triclosan

昨年度までの調査では、細菌、藻類、原生動物、甲殻類、両生類の5生物種を用いたバイオアッセイを実施してきた。これまで検討してきた医薬品類の各生物種に対する生態毒性値、試験の操作性、及び生態リスク評価における要求(栄養段階の異なる3生物種)などから、本年度新規に対象とした医薬品類については、細菌、藻類、甲殻類を用いてバイオアッセイを行った。

#### 5.3.1 細菌を用いた試験

海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を供試生物とし、発光阻害を観察するバイオアッセイを実施した。本調査では、Strategic Diagnostics Inc.社から市販されている生態毒性試験システム Microtox®を用い、システム添付のプロトコールに従って、サンプルの段階希釈系列中に5分及び15分曝露した後の発光阻害を測定し、付属の計算ソフトにより半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)を求めた。

#### 5.3.2 藻類を用いた試験

藻類を供試生物とし、暴露期間中の生長阻害を観察する「藻類生長阻害試験」は、経済協力機構(OECD)によって標準化<sup>5)</sup>されており、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)」に基づく生態毒性試験法としても規定されている。本調査では、淡水性の単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35株)を用い、藻類生長阻害試験を実施した。

Yamashitaら<sup>6)</sup>の方法を参考に、96ウェルマイクロプレート培養容器とする手法を適用し、温度24℃、照度4000Lux、振とう速度120rpmの条件下、サンプルの段階希釈系列中で96時間曝露を行った。曝露期間中は、24時間毎にマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer社、ARVO SX-1420)を用いて各ウェルの吸光度(450nm)を測定し、関係式から細胞濃度を求めて生長速度を算出した。EcoTox-Statics Ver.2.6d<sup>7)</sup>を用い、曝露開始後72時間の生長

速度と暴露濃度の関係から、半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)及び最大無影響濃度(NOEC)を求めた。

### 5.3.3 甲殻類を用いた試験

甲殻類を用いるバイオアッセイとしては、ミジンコ類の遊泳阻害を観察する「急性遊泳阻害試験」や、産仔数を観察する「繁殖試験」が、OECD テストガイドラインによって標準化<sup>8)</sup>されており、化審法に基づく生態毒性試験としても規定されている。本調査では、淡水性の鯰脚綱オオミジンコ(*Daphnia magna*)を用い、ミジンコ急性遊泳阻害試験を実施した。

供試生物の継代飼育や馴化等に用いる費用と労力を軽減するため、MicroBioTests 社から市販されている毒性試験キット(DAPHTOXKIT F<sup>TM</sup> magna)に付属する休眠卵を用い、6 ウェルマイクロプレートを培養容器として試験を行った。温度 20°C、暗条件下、サンプルの段階希釈系列中で 48 時間暴露を行い、暴露後の遊泳阻害率と暴露濃度の関係から、ECOTOX-STATICS を用い、半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)を求めた。

## 5. 4 試験結果

各医薬品類の 3 生物種に対する生態影響試験の結果をまとめると、表-5.2 のようになった。EC<sub>50</sub> や NOEC など生物に作用する濃度を示しており、数値が低いほど毒性が強いことを意味している。なお EC<sub>50</sub> については、計算値が最大暴露濃度(10mg/L)を超える場合の外挿値も、参考値として記載した。

藻類成長阻害試験では、4 物質について急性毒性値(EC<sub>50</sub>)、慢性毒性値(NOEC)が算出され、化学療法剤(抗菌剤)の Sulfamethoxazole は、EC<sub>50</sub>= 0.98mg/L、NOEC= 0.31mg/L と比較的強い毒性を示した。また、細菌の発光阻害試験では、2 物質について EC<sub>50</sub> が算出された。一方、ミジンコ急性遊泳阻害試験では、7 物質すべてについて毒性が検出されなかった。

## 5. 5 予測無影響濃度(PNEC)の算出

化学物質の水生生物に対する生態リスク評価においては、特にスクリーニング的な初期評価として、予測無影響濃度(PNEC : Predicted No Effect Concentration)と、予測環境中濃度(PEC : Predicted Environmental Concentration)を比較し、詳細な評価を行う候補物質を選定する手法が多く用いられている<sup>9)</sup>。PNECは、環境中の生物に対して有害な影響を及ぼさないと予想される濃度であり、生物試験の結果得られた毒性値から算出される。「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」<sup>9)</sup>では、急性毒性値および慢性毒性値のそれぞれについて生物群ごとに整理した上で、それぞれの中で最も低い値に対して情報量に応じ

表-5.2 本年度評価した医薬品類 7 物質の生態毒性

	(mg/L)			
	細菌 (5min)EC <sub>50</sub>	藻類 72hrEC <sub>50</sub>	藻類 96hrNOEC	ミジンコ 48hrEC <sub>50</sub>
bromovalerylurea	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
disopyramide	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
ifenprodil tartrate	N.E.	5.9.E+00	3.1.E-01	N.E.
indometacin	1.3.E+01	1.0.E+02	8.3.E+00	N.E.
sulfamethoxazole	N.E.	9.8.E-01	3.1.E-01	N.E.
thiamphenicol	5.0.E+01	1.4.E+01	8.3.E+00	N.E.
trimethoprim	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

N.E: 設定した濃度範囲において明確な影響が見られなかった。

表-5.3 医薬品類 51 物質の予測無影響濃度 PNEC

		PNEC (µg/L)	対応する試験系
抗生物質	clarithromycin	1.2.E-02	藻類-急性
抗菌薬	triclosan	1.2.E-02	藻類-急性
抗生物質	azithromycin	1.9.E-02	藻類-急性
精神神経用剤	imipramine	1.5.E-01	藻類-急性
鎮咳剤	dextromethorphan	1.6.E-01	藻類-慢性
精神神経用剤	haloperidol	1.6.E-01	藻類-急性
抗生物質	amitriptyline	1.9.E-01	藻類-急性
抗生物質	chloramphenicol	2.1.E-01	藻類-急性
精神神経用剤	chlorpromazine	2.4.E-01	藻類-慢性
抗ヒスタミン剤	promethazine	3.2.E-01	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	mefenamic acid	3.9.E-01	纖毛虫-慢性
沈着剤	diphenidol	4.1.E-01	藻類-慢性
鎮痙剤	tolperisone	4.1.E-01	藻類-慢性
化学療法剤	sulfamethoxazole	9.8.E-01	藻類-急性
糖尿病用剤	tolbutamide	1.0.E+00	細菌-急性
解熱鎮痛消炎剤	flufenamic acid	1.1.E+00	藻類-急性
利尿剤	acetazolamide	1.4.E+00	藻類-急性
合成抗菌剤	levofloxacin	1.5.E+00	藻類-急性
駆虫剤、防腐剤	thymol	1.6.E+00	細菌-急性
解熱鎮痛消炎剤	ketoprofen	2.0.E+00	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	ibuprofen	2.3.E+00	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	ciclofenac sodium	3.1.E+00	藻類-急性
循環器官用薬	ifenprodil tartrate	3.1.E+00	藻類-慢性
解熱鎮痛消炎剤	naproxen	3.1.E+00	纖毛虫-慢性
血管拡張剤	verapamil	3.1.E+00	纖毛虫-慢性
沈着剤	crotamiton	3.5.E+00	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	ethenzamide	3.7.E+00	藻類-急性
昆虫忌避薬	N,N-diethyl-m-tolamide	4.1.E+00	藻類-急性
血管拡張剤	diltiazem	4.5.E+00	藻類-急性
強心剤	caffeine	5.2.E+00	藻類-慢性
抗てんかん剤	carbamazepine	5.2.E+00	藻類-慢性
解熱鎮痛消炎剤	fenoprofen	5.7.E+00	藻類-急性
消化器官薬	metoclopramide	7.7.E+00	藻類-急性
合成抗菌剤	nalidixic acid	9.3.E+00	甲殻類-急性
高脂血症用剤	bezafibrate	1.0.E+01	藻類-慢性
血管拡張剤	dipyridamole	1.0.E+01	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	indometacin	1.3.E+01	細菌-急性
合成抗菌剤	thiamphenicol	1.4.E+01	藻類-急性
抗てんかん剤	phenytoin	2.1.E+01	纖毛虫-急性
動物用抗菌薬	novobiocin	5.3.E+01	細菌-急性

その他 11 物質は、実施した試験範囲において毒性が検出されなかった。

たアセスメント係数を適用して算出された 2 つの値のうち小さい方の値を当該物質の PNEC とする、とされている。

本検討においては、アセスメント係数として急性毒性値(EC<sub>50</sub>、LC<sub>50</sub>)に対して 1000、慢性毒性値(NOEC)に対して 100 を適用し、昨年度までに試験を実施したものを含め、医薬品類 51 物質について PNEC を整理した(表-5.3)。

これまで試験対象としてきた医薬品類 51 物質の中で、予測無影響濃度(PNEC)が 0.1µg/L 未満と算出されたものが 14 物質あり、薬効で分類すると、抗生物質(含、合成抗菌剤、化学療法剤)が 5 物質、精神神経用剤が 4 物質、解熱鎮痛消炎剤、循環器官用薬、鎮痙剤、鎮痙剤、抗ヒ

スタミン剤、殺菌剤（医薬部外品）が各1物質であった。中でも抗生物質の Azithromycin、Clarithromycin 及び殺菌剤（医薬部外品）Triclosan の3物質はPNECが0.01µg/L未滿と、比較的低い値(強い毒性)を示した。

また、PNECに対応する試験系(毒性値/アセスメント係数が最小の試験系)を見ると、藻類の急性毒性または慢性毒性が大半を占め、特にPNECが0.1µg/L未滿と比較的低い医薬品では14物質中13物質において、藻類によるバイオアッセイ結果からPNECが導出されている(3生物種の中で藻類に対する毒性が最も強い)。

### 5.6 今後の展開と課題

本研究課題の中で、これまでに医薬品類51物質について生態毒性データの収集を行い、予測無影響濃度PNECを把握してきた。その結果、水環境中に存在する医薬品類の中には、水生生物に対して毒性を示す物質が含まれていることが確認された。中でも、抗生物質の Azithromycin、Clarithromycin 及び殺菌剤（医薬部外品）Triclosan の3物質はPNECが0.01µg/L未滿の比較的強い毒性を示した。

また、本検討の中で対象とした医薬品類、バイオアッセイ手法の範囲では、比較的高い毒性が検出された物質の多くが、藻類に対して最も強い毒性を示したことから、医薬品類の水生生物に対する生態影響を検討するうえで、藻類成長阻害試験がスクリーニング的に活用できる可能性が示された。ただし、各生物種に対する生態毒性の大きさは物質により様々であり、生態系に対する医薬品類の影響を詳細に検討する際には、複数の生物種を用いた試験を行う必要があると考えられる。

## 6. 河川における医薬品類の生態リスク評価

### 6.1 目的

近年、水環境中における多様な医薬品類の存在実態が多く報告されており、それらの物質の生態毒性データについても知見が収集されつつある。今後は、これまで得られた知見に基づき生態リスク評価を行うことで、より詳細な情報収集が必要な医薬品類の把握を進めていくことが必要となる。そこで本研究では、実河川を対象に、医薬品類による生態リスクに関する検討を行った。

### 6.2 調査方法

#### 6.2.1 調査地点

2つの異なる水系の小河川15地点、都市水路4地点の計19地点を調査対象とした。

#### 6.2.2 水質分析

各調査地点において、表-5.1に示した医薬品類44物質の溶存態成分を対象とした。Triclosan、Thymolの2物質

表-6.1 河川19地点における医薬品類44物質に由来する生態リスク

		Σ(MEC/PNEC)	Σ(MEC/PNEC)への寄与が大きい物質 [Σ(MEC/PNEC)(寄与率)]	
			寄与率1位	寄与率2位
KS-1	自然河川	0.85	clarithromycin 0.36 (42%)	triclosan 0.34 (40%)
KS-2	自然河川	0.82	clarithromycin 0.43 (53%)	triclosan 0.26 (32%)
KB-1	自然河川	1.10	triclosan 0.53 (47%)	clarithromycin 0.52 (46%)
YM-1	自然河川	0.43	clarithromycin 0.24 (56%)	triclosan 0.15 (34%)
YM-2	自然河川	0.72	triclosan 0.40 (55%)	clarithromycin 0.24 (33%)
SD-1	自然河川	0.32	clarithromycin 0.18 (55%)	triclosan 0.12 (37%)
SD-2	自然河川	0.96	clarithromycin 0.78 (81%)	triclosan 0.13 (13%)
TD-1	自然河川	0.30	clarithromycin 0.16 (53%)	triclosan 0.12 (39%)
TD-2	自然河川	0.36	clarithromycin 0.22 (60%)	triclosan 0.12 (32%)
TD-3	自然河川 (放流口直近)	3.8	clarithromycin 3.3 (87%)	azithromycin 0.15 (4%)
TD-4	自然河川	0.35	clarithromycin 0.20 (58%)	triclosan 0.12 (34%)
TD-5	自然河川	0.31	clarithromycin 0.17 (54%)	triclosan 0.12 (38%)
TD-6	自然河川 (放流口直近)	2.1	clarithromycin 1.7 (80%)	triclosan 0.18 (8%)
TD-7	自然河川	0.33	clarithromycin 0.18 (55%)	triclosan 0.12 (35%)
TD-8	自然河川	0.47	clarithromycin 0.29 (62%)	triclosan 0.14 (30%)
TJ-1	水路 (河川水)	0.32	clarithromycin 0.17 (52%)	triclosan 0.13 (39%)
TJ-2	水路 (処理水)	0.55	triclosan 0.29 (53%)	clarithromycin 0.19 (35%)
EG-1	水路 (処理水)	0.45	clarithromycin 0.29 (65%)	triclosan 0.12 (26%)
IR-1	水路 (処理水)	0.34	clarithromycin 0.20 (58%)	triclosan 0.12 (34%)

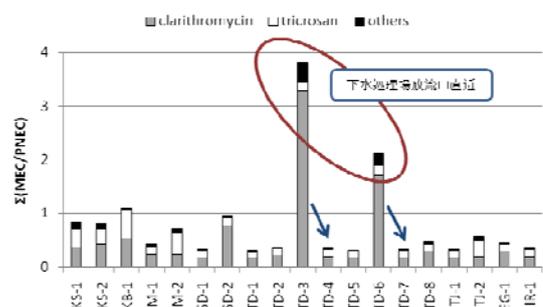


図-6.1 医薬品類由来生態リスクの比較

は宝輪らの方法<sup>10)</sup>を参考に前処理などを行った後、GC/MSで測定を行い、内標準法にて定量した。その他の42物質は3.2で述べた方法(LC/MS/MSで測定し絶対検量線法で定量)により分析を行った。

### 6.2.3 生態リスク評価

5. 5 で述べたように、化学物質の水生生物に対する生態リスク評価においては、予測無影響濃度(PNEC)と、予測環境中濃度(PEC)を比較し、詳細な評価を行う候補物質を選定する手法が多く用いられている<sup>9)</sup>。本検討では、各医薬品類について、6.3.1 の水質分析により得られた実測濃度MECと表-5.3 で示した予測無影響濃度PNECの比 [MEC/PNEC] を求めた。

さらに、調査対象物質全体としての生態リスクについても検討した。多種類の物質が共存する場合の複合影響について評価する手法は確立されていないが、相加性を仮定し個々の物質の影響(リスク)の総和を混合物の影響(リスク)とみなして評価する手法が比較的広く用いられている<sup>11)</sup>。この仮定のもとでは、混合物全体としての生態リスクは、個々の物質の生態リスクの合計値 ( $\Sigma$ (MEC/PNEC)) で表現される。医薬品類の水生生物に対する作用機序は十分明らかにされておらず、それに基づく詳細な検討はできないが、本検討では全ての医薬品類について、水生生物に対する毒性が濃度相加的 (concentration additive) であると仮定し、各地点における  $\Sigma$ (MEC/PNEC) を算出した。

### 6. 3 調査結果

#### 6.3.1 医薬品類の存在実態

44 物質中 38 物質が 19 地点のいずれかで検出され、Azithromycin、Caffeine、Clarithromycin、Crotamiton、Fenoprofen、N,N-Diethyl-m-toluamide の 6 物質は、19 地点全てにおいて検出された。また、19 地点における最大検出濃度が 100ng/L と比較的高濃度であったのは、Caffeine (570ng/L)、Crotamiton (510ng/L)、Sulpiride (1500ng/L) の 3 物質であった。

#### 6.3.2 生態リスク評価

調査河川 19 地点における医薬品類 44 物質の生態リスクについて、概要を表 6-1 及び図 6-1 に示す。19 地点すべてにおいて、 $\Sigma$ (MEC/PNEC) は 0.1 以上となり、なかでも下水処理場放流口直近の 2 地点 TD-3 と TD-6 では、それぞれ 3.8、2.1 という高い  $\Sigma$ (MEC/PNEC) 値を示した。PNEC の算出においてはアセスメントファクター(安全係数)が乗じられているなど、安全側の評価がされており、直ちに水生生物への影響が生じるとは限らないが、生態影響の観点から、さらなる医薬品類の実態/挙動に関する情報の収集が必要であると考えられる。なお、数百メートル下流の地点 TD-4 及び TD-7 では、放流口上流の地点 TD2 及び TD-5 と同程度の  $\Sigma$ (MEC/PNEC) 値に低下していた。

一方、個々の物質の MEC/PNEC 比では、抗生物質 Clarithromycin と殺菌剤 Triclosan の 2 物質が、全ての地点

で 0.1 以上であり、その他の物質では、抗生物質 Azithromycin(1 地点)、強心剤 Caffeine(1 地点)、鎮痒剤 Crotamiton(2 地点)の 3 物質が、MEC/PNEC 比が 0.1 を超える地点があった。Clarithromycin、Triclosan の 2 物質の  $\Sigma$ (MEC/PNEC) に対する寄与は、19 地点全てにおいて 8 割以上を占め、うち 18 地点で両者が 1、2 位であった。2 者のうち、Clarithromycin は MEC/PNEC 比が大きな変動を示した(0.16~3.3)のに対し、Triclosan の MEC/PNEC 比の変動は比較的小さかった(0.12~0.53)。

### 6. 4 今後の展開と課題

本検討で行った、複数の医薬品類に由来する生態リスクの評価においては、複合毒性について単純な相加性を仮定している。医薬品類の水生生物への影響における複合作用については十分な知見が得られていないが、最新の知見を収集することなどによって、随時妥当性を検討していく必要がある。

今後は、地域的、時間的に異なる様々な河川水中に含まれる医薬品類の存在実態に関する情報を収集し、幅広い水域や様々な流域特性の河川における生態リスク評価の事例を蓄積する。また、河川水中に形成される生物相の現地調査データや、バイオアッセイによる河川水の毒性試験データを併せて集積し、それらの相互関係から、医薬品等の生理活性物質が生態系に及ぼす影響の評価手法を検討・構築することを目指す。

## 7 まとめ

医薬品分析法の開発については、社会的な関心がみられる抗ウイルス剤の一つである Oseltamivir phosphate (OP) とその活性体 Oseltamivir carboxylate (OC) を対象とした。分析装置の検出下限値は試料換算濃度で OP が 0.34ng/L、OC が 0.29ng/L であった。また、流入下水を用いた添加回収試験の結果、OP、OC とも 80% の回収率が得られ下水試料への適用可能性が確認された。

晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出特性を比較した。雨天時において晴天時の 10 倍あるいはそれ以上の濃度で流出する医薬品類がみられ、水環境中における医薬品類調査における雨天時調査の重要性が明らかになった。

湖沼流入河川の医薬品負荷量から算出した流入河川の平均濃度と湖沼内の医薬品濃度を比較した。N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、晴天時河川流入以外にも負荷が存在する可能性が示された。

バイオアッセイ手法による医薬品類生態影響評価では、

新規に7医薬品類について生態毒性試験を実施し、生態影響データを把握した。その中で、化学療法剤(抗菌剤)のSulfamethoxazoleは、藻類に対する $EC_{50}=0.98\text{mg/L}$ 、 $NOEC=0.31\text{mg/L}$ と、比較的強い毒性を示した。昨年度までの成果と併せると、抗生物質(合成抗菌薬、化学療法剤を含む)と精神神経用剤(抗てんかん剤を含む)に、比較的強い毒性を示す物質が多く見られ、中でも抗生物質のAzithromycin、Clarithromycin及び殺菌剤(医薬部外品)Triclosanの3物質はPNECが $0.01\mu\text{g/L}$ 未満の比較的強い毒性を示した。また、医薬品類の水生生物に対する生態影響を検討するうえで、藻類生長阻害試験がスクリーニングに有用である可能性が示された。

河川における医薬品類の生態リスク評価では、小河川15地点、都市水路4地点を対象に調査を行った。その結果、MEC/PNEC比は19地点全てで0.1を超えており、引き続き医薬品類の挙動に関して情報を収集する必要があると考えられる。中でも、Clarithromycin、Triclosanの2物質の寄与が特に大きい可能性が示された。

#### 参考文献

- 1) 中外製薬：インタビューフォームタミフルカプセル 75、2009年
- 2) Ghosh, G.C. et al.: Oseltamivir Carboxylate, the Active Metabolite of Oseltamivir Phosphate (Tamiflu), Detected in Sewage Discharge and River Water in Japan, *Environ. Health Perspect.*, **118**, pp.103-107, 2010
- 3) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明：環境工学研究論文集、**43**、pp.73-82、2006年
- 4) 小森行也、岡安祐司、鈴木穰：下水道未整備地域の小河川における医薬品の実態調査、学会誌「EICA」、**12** (2/3), pp.37-44、2007年
- 5) OECD: Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, adopted March 2006.
- 6) Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H.: Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms, *Water Sci. Technol.*, **53**, pp.65-72, 2006
- 7) 吉岡義正, 2001, Ecotox-Statics ver.2.x, 環境毒性学会誌 4(2), 113
- 8) OECD: Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test, adopted April 2004.
- 9) 環境省：[3] 生態リスク評価、化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン(平成22年1月版)、pp.19-25、2010年。

- 10) 宝輪勲、宮崎沙頼、中田典秀、小森行也、田中宏明：GC-MSによる環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討、第16回環境化学討論会講演要旨集、pp.774-775、2007
- 11) European Chemicals Bureau (2008) TNsG on Product Evaluation

## A STUDY ON BEHAVIOR OF PHYSIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES AND THEIR ADVERSE EFFECTS ON ECOSYSTEM

**Budget:** Grants for operating expenses

General account

**Research Period:** FY2006-2010

**Research Team:** Water Quality Team,

Water Environment Research Group

**Author:** MINAMIYAMA, Mizuhiko

KOMORI, Koya

KITAMURA, Tomokazu

MURAYAMA, Kouki

**Abstract:** In recent years, physiological active substances (e.g., pharmaceuticals) resident in the water environment have become an emerging public concern. However, limited knowledge is available on the significance of their occurrence in the water environment from the viewpoints of biological adverse effects. We tried the first approach of risk evaluation for pharmaceuticals in rivers onto aquatic organisms. The objectives of this research were to determine the occurrence of selected pharmaceuticals in river water and to evaluate the impacts of physiological active substances onto aquatic organisms.

**Key words:** pharmaceuticals, analytical method, river, bioassays, ecological impact assessment